

## 骨髓移植の基礎的研究

### 抗胸腺細胞血清による免疫担当細胞の除去について

金沢大学医学部内科学第3講座 (主任: 服部絢一教授)

幸 道 秀 樹

(昭和55年2月29日受付)

近年の免疫遺伝学のめざましい発展に伴って、骨髓移植は重症再生不良性貧血、急性白血病あるいは先天性免疫不全症に対する有力な治療法とみなされ、世界で既に900例以上の実施例が積みあげられている。しかしHLA-identical siblingをdonorとしても、時には致命的でもあるgraft-versus-host reaction (GVHR)が高率に出現し、その予防および治療は骨髓移植の最大の課題である<sup>1)</sup>。GVHRはgraft中のdonor T cellがhostの組織適合性抗原をnot-selfと認識かつ増殖して、その結果産生されるcytotoxic T cellによって生ずる免疫反応<sup>2)</sup>であり、このGVHRの予防および軽減の方法として1)薬剤による処理、2)抗リンパ球抗体による処理、3)物理的手段によるdonor T cellの除去、4)donor T cell抗原特異的なGVH反応性の抑制などがあげられる。これらの方法のうち原田らは既に、density gradient separationによってマウス<sup>3)</sup>およびヒト骨髓細胞<sup>4)</sup>から免疫担当細胞を除去しうることを報告しているが、本論文はanti-thymocyte serum (ATS)により免疫担当細胞を除去することを目的とし、その際に起こりうる、1)造血幹細胞に対する影響、2)免疫反応の抑制について検討したものである。

#### 材料および方法

##### 1. マウス

6~12週令のC3H/He (H-2<sup>b</sup>)、C57BL/6 (H-2<sup>b</sup>)、(静岡実験動物)および家兔(北陸実験動物)を使用した。

##### 2. 抗血清

Rabbit anti-mouse thymocyte serum は、Gray

ら<sup>5)</sup>の方法により $1 \times 10^8$ のC3Hマウス胸腺細胞をcomplete Freund's adjuvantとともにウサギのfootpadsに注入、4週間後に同量の細胞を3日間連続して腹腔内に注射し、7日後に採血した。また変法<sup>6)</sup>として同量の細胞をadjuvantなしにウサギの背部に皮下注射し、4週間後に同量の細胞を3日間連続して静注し、7日後に採血した。得られた血清を56℃で30分間の非動化後マウスの赤血球、肝、腎で吸収したものをcrude RATS、さらにBalb/c由来の形質細胞腫MOPC 31Cで吸収したものをRATSとした。一部はさらに骨髓細胞(RATS/BM)あるいは胎児肝細胞で吸収した(RATS/FL)。また正常ウサギより得られた血清を同様に非動化後、マウスの赤血球、肝、腎で吸収したものをnormal rabbit serum (NRS)として使用した。吸収は血清と組織を容積比で2:1に混和し、断続的に振盪しながら37℃、30分間各々一度ずつ行った。形質細胞腫は金沢大学付属ガン研究所分子免疫部より提供されたものである。

##### 3. 細胞障害試験

倍数希釈した抗血清に、補体、target cell浮遊液( $1 \times 10^7$ )を各0.05 mlずつ加え、37℃、45分間incubateして0.25% trypan blueによるdye exclusion testを行った。Target cellにはC3Hマウス胸腺細胞、脾細胞、骨髓細胞を用い、浮遊液は10%のfetal calf serumを加えたRPMI-1640 (GIBCO)を使用した。これは以下の実験における培養液としても使用した。使用した補体は乾燥モルモット補体(極東製薬)を4倍に希釈したものである。

##### 4. 抗血清による前処理

骨髓細胞あるいは脾細胞に20倍希釈の抗血清と補

Fundamental Studies on Bone Marrow Transplantation; Elimination of Immunocompetent Cells from Spleen and Bone Marrow Cells by Anti-Thymocyte Serum for Prevention of Graft-Versus-Host Reaction. **Hideki Kodo**, Department of Internal Medicine (III) (Director: Prof. K. Hattori) School of Medicine, Kanazawa University.

体を等量ずつ加え、37℃、30分間 incubate 後、培養液で洗浄し使用した。

#### 5. 造血幹細胞活性

i) 脾コロニー法 (CFU - s): Till & McCulloch<sup>7)</sup>の方法により、抗血清処理した C3H マウスの骨髓細胞  $15 \times 10^4$  を致死量 X 線照射 (900R) した同系マウスに静注後、9 日目に脾を摘出し、Bouin 氏液に浸して脾コロニーを算定した。

ii)  $^{59}\text{Fe}$  spleen uptake 法: Bennett ら<sup>8)</sup>の方法に準じて抗血清処理した C3H マウスの骨髓細胞  $2 \times 10^6$  を致死量 X 線照射した同系マウスに静注、6 日後に  $0.2\mu\text{Ci}$  の  $^{59}\text{FeCl}_3$  を腹腔内投与し、17 時間後の脾における  $^{59}\text{Fe}$  uptake をガンマカウンターで測定した。

#### 6. Mitogen に対する反応性

試験管法により、マウス脾細胞の phytohemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con A), pokeweed mitogen (PWM), lypopolysaccharide (LPS) に対する反応性における抗血清の影響を検討した。予備実験成績により、脾細胞  $2.5 \times 10^6/0.5\text{ml}$  に至適濃度の各 mitogen, すなわち  $1.0\mu\text{l}$  の PHA (Difco),  $5.0\mu\text{l}$  の Con A (Boehringer),  $20\mu\text{l}$  の PWM (GIBCO) および  $20\mu\text{g}$  の LPS Difco をそれぞれ加え、5%  $\text{CO}_2$ , 37℃の incubator で 48 時間培養し、培養終了 8 時間前に  $1\mu\text{Ci}$  のトリチウムサイミジン ( $^3\text{H}$ -TdR) を添加した。培養終了後細胞をフィルター (GF/C, Whatman) に採取し、そのトリクロル酢酸不溶分画への  $^3\text{H}$ -TdR incorporation を液体シンチレーションカウンターを用いて測定した。

#### 7. One-way Mixed Lymphocyte Culture, MLC

$1.25 \times 10^6/0.25\text{ml}$  の C57BL マウスの脾細胞を

Mitomycin C (MMC) 処理した後、無処理あるいは抗血清処理して stimulator とした。また同量の C3H マウスの脾細胞を無処理あるいは抗血清処理して responder とした。MLC は 72 時間培養し、mitogenic response と同様に  $^3\text{H}$  - TdR を添加し、 $^3\text{H}$ -TdR の取り込みを測定した。

#### 8. GVHR assay

i) Sharkins<sup>9)</sup>らの方法により、抗血清処理した C57BL の脾細胞  $20 \times 10^6$  と骨髓細胞  $2 \times 10^6$  を致死量 X 線照射 (900R) した C3H マウスに移植し、4 日後に脾を取り出し、その脾細胞  $5 \times 10^5$  を  $1\mu\text{Ci}$  の  $^3\text{H}$ -TdR とともに 8 時間培養し、その spontaneous  $^3\text{H}$ -TdR uptake を mitogen response の場合と同様に測定した。

#### ii) Survival assay

抗血清処理した C57BL の脾細胞  $20 \times 10^6$  と骨髓細胞  $2 \times 10^6$  を抗血清処理し、致死量の X 線照射した C3H マウスに移植し経過を観察した。マウスは 1 ケージに 5 匹ずつ、conventional な環境で 40 日まで毎日観察した。

なお in vitro の実験はすべて triplicate 以上で行い表 5～9 は 3 回以上の実験をまとめて表わしたものである。得られた結果は Student's t test で検定し、P の値が 0.05 以下を有意、0.10 以上を有意でないと判定した。

### 成 績

#### 1. 細胞障害試験

得られた抗血清の力価を補体依存性の細胞障害試験で検定した。

Gray らの方法および変法で作製した crude RATS はともに胸腺細胞 (T) に対して  $2^8$  倍希釈でも 95% の

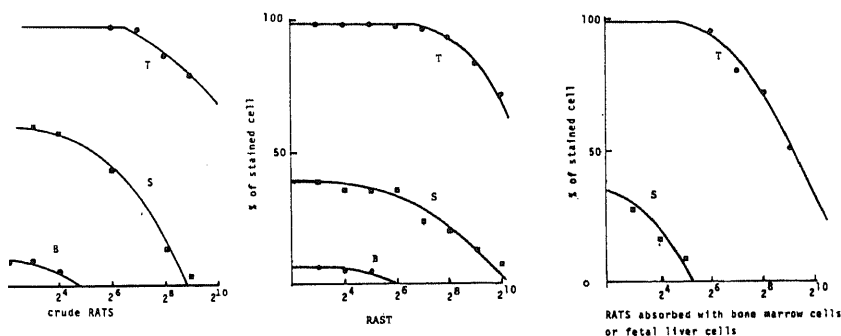


Fig. 1. Cytotoxic Activity of RATS against Thymocytes (T), Spleen Cells (S), and Bone Marrow Cells (B)

cytotoxicityを示し、脾細胞(S)に対しては $2^2$ 倍希釈で60%、骨髓細胞(B)に対しては $2^2$ 倍希釈で10%であった(図1, 左). よって抗血清の作製方法にかかわらず一括して使用している. 一方 RATS の cytotoxicity は脾細胞に対しては $2^2$ 倍希釈で40%と減少したが、骨髓細胞に対しては7%であった(図1, 中). この RATS を骨髓細胞や胎児肝細胞で吸収しても、cytotoxicity に著明な変化はなかった(図1, 右).

以上の成績により、以後の実験には20倍希釈の抗血清を使用した.

## 2. 幹細胞活性への影響

### i) 脾コロニー法

抗胸腺細胞血清の pluripotent stem cell に対する影響を CFU-s でもって検討した.

表1のように、NRS と補体で処理した C3H マウス 骨髓細胞  $15 \times 10^4$  当りのコロニー数は  $12.2 \pm 2.6$  であったが(NRS 処理群), crude RATS と補体で処理すると(crude RATS 処理群), コロニー数は  $4.0 \pm 2.4$  と有意に減少した. この crude RATS をさらに形質細胞腫で吸収しても(RATS 処理群), コロニー数は  $3.0 \pm 2.0$  であり、コロニー数の減少は回復しなかった. よって以下の実験には、この RATS を使用した. まず最初にモルモット補体の影響を検討した. 表2のように、RATS のみではコロニー数は  $5.5 \pm 1.8$  であり補体を添加しても脾コロニーは  $5.3 \pm 0.9$  と有意な影響

を与えず、補体がなくても RATS はそれ自身で脾コロニーを減少した. 次に表3のように、この幹細胞抑制活性を除くために、骨髓細胞で吸収した RATS を使用した(RATS/BM 処理群)ところ、そのコロニー数は  $3.8 \pm 1.8$  と推計学的に RATS 処理群と同じであった. また、RATS を生後48時間後のマウス肝細胞で吸収した(RATS/neonatal liver 処理群)ところ、コロニー数は  $3.3 \pm 0.9$  でありこの幹細胞抑制活性は消失しなかった. ところが胎児肝細胞で RATS を吸収すると(RATS/FL 処理群), 脾コロニー数は  $15.6 \pm 2.5$  であり NRS 群と推計学的に有意差はなく、幹細胞抑制活性は完全に消失した.

### ii) $^{59}\text{Fe}$ spleen uptake 法

ATS の赤芽球系の幹細胞に対する影響を脾における  $^{59}\text{Fe}$  の取り込みで測定した(表4). NRS 処理群の  $^{59}\text{Fe}$  uptake を100%とした relative  $^{59}\text{Fe}$  uptake で比較すると、RATS 処理群は  $41.1 \pm 26.6\%$  とやはり明らかな減少を示した. しかし CFU-s で検討した成績と異なり、RATS/BM 処理群では  $83.2 \pm 23.1\%$  と有意な回復がみられた. この幹細胞抑制効果は、RATS を胎児肝細胞で吸収すると完全に消失した.

## 3. 免疫反応への影響

i) Mitogen に対する反応への影響: PHA, ConA, PWM に対する反応性において NRS 処理群に比べ、RATS および RATS/FL 処理群では、 $^3\text{H}$ -TdR の uptake はほぼ1/10と著明に減少したのに対し、LPS

Table 1. Inhibitory effects of crude RATS and RATS on CFU-s in presence of complement

| Treated with              | No. of mice tested | No. of CFU-s (M $\pm$ SD) | Significance        |
|---------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------|
| Normal rabbit serum (NRS) | 6                  | $12.2 \pm 2.6$            |                     |
| Crude RATS*               | 15                 | $4.0 \pm 2.4$             | Yes ( $p < 0.005$ ) |
| RATS**                    | 15                 | $3.0 \pm 2.0$             | Yes ( $p < 0.005$ ) |

\* Rabbit ATS absorbed with RBC, liver and kidney.

\*\* Rabbit ATS farther absorbed with plasmacytoma (MOPC 31C), RATS in the following tables was treated with the above procedure.

Table 2. Effects of RATS in the presence or absence of exogeneous complement

| Treated with    | No. of mice tested | No. of CFU-s (M $\pm$ SD) | Significance |
|-----------------|--------------------|---------------------------|--------------|
| NRS             | 10                 | $15.0 \pm 0.9$            |              |
| NRS+complement  | 6                  | $12.9 \pm 2.7$            | No           |
| RATS            | 10                 | $5.5 \pm 1.8$             |              |
| RATS+complement | 10                 | $5.3 \pm 0.9$             | No           |

に対する反応は軽度の減少を示した(表5)。

ii) MLC に対する影響: Responder を抗血清処理した場合(表6), NRS 処理群の  $^3\text{H-TdR uptake}$   $5043.0 \pm 978.7$  に対し, RATS 処理群は  $527.7 \pm 161.3$ , RATS/FL 処理群は  $562.6 \pm 228.2$  と明らかに減少し, RATS および RATS/FL 処理群の間には有意な差はなかった。一方 stimulator を抗血清処理した場合は(表7), 軽度の減少を示したが推計学的には

有意ではなかった。

iii) GVH assay に対する影響: 表8に示すように NRS 処理群の spontaneous  $^3\text{H-TdR uptake}$  を 100% として表わすと, RATS 処理群は  $10.3 \pm 3.1\%$ , RATS/FL 処理群は  $10.2 \pm 4.6\%$  と著明な減少を示し, syngeneic control と有意な差はなかった。

iv) Survival assay に対する影響: X線照射のみで移植されなかった C3H マウスはすべて9日以内に死

Table 3. Effects of RATS absorbed with various tissues on CFU-s in the presence of complement

| Treated with          | No. of mice tested | No. of CFU-s (M $\pm$ SD) | Significance  |
|-----------------------|--------------------|---------------------------|---------------|
| NRS (control)         | 11                 | 12.9 $\pm$ 2.7            |               |
| RATS                  | 9                  | 4.4 $\pm$ 1.0             | Yes (p<0.001) |
| PATS/BM*              | 8                  | 3.8 $\pm$ 1.8             | Yes (p<0.001) |
| RATS/neonatal liver** | 10                 | 3.3 $\pm$ 0.0             | Yes (p<0.001) |
| RATS/FL***            | 8                  | 15.6 $\pm$ 2.5            | No            |

\* absorbed with bone marrow cells.

\*\* absorbed with liver from 48-hour-old mice.

\*\*\* absorbed with fetal liver.

Table 4. Effects of RATS absorbed with various tissues on  $^{59}\text{Fe}$  spleen uptake in the presence of complement

| Treated with  | No. of mice tested | $^{59}\text{Fe}$ uptake (%)*<br>(M $\pm$ SD) | Relative $^{59}\text{Fe}$<br>uptake (%)**<br>(M $\pm$ SD) | Significance  |
|---------------|--------------------|--|---|---------------|
| NRS (control) | 11                 | 9.5 $\pm$ 2.3                                | 100   |               |
| RATS          | 10                 | 3.9 $\pm$ 2.5                                | 41.1 $\pm$ 26.6   | Yes (p<0.001) |
| RATS/BM       | 11                 | 7.9 $\pm$ 2.2                                | 83.2 $\pm$ 23.1   | No            |
| RATS/FL       | 8                  | 9.2 $\pm$ 2.6                                | 96.8 $\pm$ 27.1   | No            |

\* Percent  $^{59}\text{Fe}$  uptake =  $\frac{^{59}\text{Fe uptake per each spleen of tested mice}}{\text{Radioactivity of total } ^{59}\text{Fe injected}}$

\*\* Relative  $^{59}\text{Fe}$  uptake =  $\frac{^{59}\text{Fe uptake per each spleen of tested mice}}{\text{Mean } ^{59}\text{Fe uptake per each spleen of control mice}}$

Table 5. Mitogenic responses of spleen cells treated with RATS and complement

N=4

| Treated with   | $^3\text{H-TdR}$ incorporation (cpm) |                      |                      |                      |                       |
|----------------|--------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|-----------------------|
|                | Control                              | PHA added            | Con A added          | PWM added            | LPS added             |
| None (control) | 4525.2 $\pm$ 806.0                   | 11142.9 $\pm$ 2144.2 | 30583.6 $\pm$ 5541.8 | 11893.7 $\pm$ 2803.8 | 20460.1 $\pm$ 3302.0  |
| RATS           | 1097.2 $\pm$ 470.8*                  | 1404.7 $\pm$ 604.1*  | 2371.2 $\pm$ 293.3*  | 1487.1 $\pm$ 750.9*  | 11416.8 $\pm$ 2706.8* |
| RATS/FL        | 1249.6 $\pm$ 361.4**                 | 1564.1 $\pm$ 593.8** | 2947.5 $\pm$ 370.1** | 1430.6 $\pm$ 495.3** | 9280.9 $\pm$ 3203.1** |

\* significant (p<0.02), compared to control.

\*\* not significant, compared to RATS treated group.

Table 6. Responding activity in MLC of spleen cells treated with RATS and complement

| Treated with  | Res. × Stim. | <sup>3</sup> H-TdR incorporation (cpm) | Significance   |
|---------------|--------------|--|----------------|
| None          | C3H × C3Hm*  | 1333.7 ± 281.2                         | Yes (p < 0.02) |
| None          | C3H × C57BLm | 4395.1 ± 260.7                         |                |
| NRs (control) | C3H × C57BLm | 5043.0 ± 978.7                         |                |
| RATS          | C3H × C57BLm | 527.7 ± 161.3                          |                |
| RATS/FL       | C3H × C57BLm | 562.6 ± 228.2                          |                |

\* treated with Mitomycin C.

Table 7. Stimulating activity in MLC of spleen cells treated with RATS and complement N=3

| Treated with  | Resp. × Stim. | <sup>3</sup> H-TdR incorporation (cpm) | Significance |
|---------------|---------------|--|--------------|
| None          | C3H × C3Hm    | 1333.7 ± 281.2                         | No           |
| None          | C3H × C57BLm  | 4395.1 ± 260.7                         |              |
| NRS (control) | C3H × C57BLm  | 5043.0 ± 978.7                         |              |
| RATS          | C3H × C57BLm  | 2770.7 ± 1329.6                        |              |
| RATS/FL       | C3H × C57BLm  | 2383.0 ± 1155.6                        |              |

Table 8. Effects of RATS on GVHR

N=3

| Donor | Treated with  | Irradiated recipient | <sup>3</sup> H-TdR incorporation (cpm) (relative uptake*) | Significance   |
|-------|---------------|----------------------|---|----------------|
| None  | None          | C3H                  | 4707.6 ± 2344.9 (5.6 ± 3.4)                               | Yes (p < 0.01) |
| C3H   | None          | C3H                  | 7506.6 ± 109.7 (9.0 ± 0.1)                                |                |
| C57BL | NRS (control) | C3H                  | 83472.2 ± 1364.2 (100)                                    |                |
| C57BL | RATS          | C3H                  | 8580.8 ± 2588.0 (10.3 ± 3.1)                              |                |
| C57BL | RATS/FL       | C3H                  | 8536.7 ± 3834.0 (10.2 ± 4.6)                              |                |

\* relative uptake =  $\frac{\text{Radioactivity of tested mice}}{\text{Radioactivity of control mice}}$ 

Table 9. Effects of RATS on fatal GVHR

| Donor | Treated with | Irradiated recipient | No. dead/ Total injected | dead (%) | Mice died at days                             |
|-------|--------------|----------------------|--------------------------|----------|---|
| None  | None         | C3H                  | 12/12                    | 100      | 5, 6, 7, 7, 7, 7, 7, 7, 9, 9, 9, 9            |
| C57BL | NRS          | C3H                  | 13/13                    | 100      | 5, 5, 8, 8, 8, 10, 10, 10, 10, 12, 12, 12, 12 |
| C57BL | RATS         | C3H                  | 10/10                    | 100      | 8, 10, 12, 12, 12, 14, 14, 14, 14, 14         |
| C57BL | RATS/FL      | C3H                  | 4/15                     | 27       | 13, 14, 14, 28                                |

亡し、NRS 処理群では 12 日、RATS 処理群でも 14 日以内にすべて死亡するのに対し、RATS/FL 処理群では 70 % 以上のマウスに 40 日以上長期生存を得た (表 9)。なお、死亡マウスの症状は、主に全身衰弱と下痢であるが、これは照射のみの群、および RATS 処理群との間に著明な差はみられなかった。

## 考 案

抗リンパ球血清 (ALS) あるいは ATS は骨髓移植の conditioning<sup>10,11)</sup> や GVHR の治療<sup>12)</sup> に試みられているが、問題となるのは造血幹細胞と交叉反応を示すことである。Mookerjee ら<sup>13)</sup> はマウスの CFU-s を使い、ATS は造血幹細胞を抑制しないと述べているが、マウス<sup>14)</sup>、ラット<sup>15)</sup> やヒト<sup>16)</sup> についての他の研究では ALS の造血幹細胞に対する抑制効果が示されている。本研究によっても脾コロニー法と <sup>59</sup>Fe spleen uptake 法を用いることにより、RATS がマウスの造血幹細胞を著明に抑制することが明らかにされた (表 1, 2, 3, 4)。これは、マウスにおける CFU-c を用いた Mosedale ら<sup>17)</sup> の研究と一致するものである。Rodt ら<sup>18)</sup> は、肝や形質細胞腫で吸収した抗マウス脳血清は CFU-s を抑制しないと述べているが、本研究における追試では対照と同様な抑制効果を示した。マウスの脳組織と多能性幹細胞の間には共通抗原が存在しており<sup>19)</sup>、幹細胞の抗原は B-リンパ球に表現されているものとは異なるともいわれており<sup>20)</sup>、これらのことから、我々の CFU-s 活性も主に胸腺細胞に対する抗体そのものによるものであろう。

幹細胞抑制効果を発現するために、補体が必要かどうかについては研究者間で一致していない点が多い。Tyan ら<sup>21)</sup> は補体自身が CFU-s に対する中等度の抑制効果を持ち、Filppi ら<sup>20)</sup> や他の研究者<sup>22)</sup> は、補体は CFU-s や CFU-c に対する抑制効果を増幅するという成績を示している。一方、Monette ら<sup>19)</sup> は抗マウス脳血清は幹細胞を抑制するのに補体を必要としないと述べている。我々の成績では RATS が CFU-s を抑制するのに、補体の添加非添加は何の影響もみられなかった (表 2)。この成績は上述の Monette らと一致するものである。こういう抗血清の幹細胞抑制効果のメカニズムに関して、1) 抗血清の直接作用、2) 抗血清で覆われた細胞の造血組織への生着能力の低下<sup>19)</sup>、3) 抗血清処理細胞の移植後における体内の補体の役割<sup>19)</sup> などがあげられているが詳細は不明である。

このような抗幹細胞活性を除去する試みの一つに吸収操作がある。我々の成績 (表 3, 4) では、RATS/BM は Monette ら<sup>19)</sup> と同様に CFU-s に対する抑制効果を

持っていたが、<sup>59</sup>Fe spleen uptake 法では抑制効果は有意に減少した。この多能性幹細胞と赤芽球幹細胞に対する効果の差は、ヒトにおいて多能性幹細胞を測定する方法が確立していない現在、抗ヒト胸腺細胞血清を評価する際に重要であると考えられる。適当な吸収をした抗マウス脳血清は CFU-c に影響を与えず<sup>23)</sup>、また CFU-s と CFU-e の抗原性の違いも指摘されており<sup>24)</sup>、多能性幹細胞と赤芽球系の幹細胞の間の抗原性の差を示唆するものとして興味深い。

新生児マウス肝細胞は比較的多量の細胞が入りやすいので、生後 48 時間のマウス肝細胞で吸収を試みたが幹細胞に対する効果に差はなかった。しかし胎児肝細胞で吸収したところ、抗幹細胞活性は消失した (表 3, 4)。胎児幹細胞は造血幹細胞を含み、免疫担当細胞を欠いており<sup>25)</sup>、現に重症複合免疫不全症に対する移植に使用されていて<sup>26)</sup>、胎児肝による吸収は ATS より抗幹細胞活性を除去するのに最も効果的であろう<sup>17,20)</sup>。この抗血細胞活性は ATS を IgG<sup>17)</sup> や Fab<sup>27)</sup> に分画することでも除去可能といわれるが、Rodt ら<sup>28)</sup> は、吸収していないヒトの ATG はやはり CFU-c を抑制することを認めており、抗マウス脳血清でも同様のことが言われている<sup>19)</sup>。したがって、単に分画化だけでは幹細胞抑制効果の除去は十分でないと考えられる。

このように幹細胞抑制効果を除去した RATS/FL が RATS と同様な抗 T 活性を保持しているかが次の問題となる。RATS/FL で前処理した脾細胞の PHA, Con A, PWM に対する反応性は著明に減少し、RATS 処理群と同様であった (表 5)。PHA と Con A はともに T-cell mitogen とされ、マウスの脾細胞には Con A に反応する population がある<sup>29)</sup>といわれるが、抗血清は PHA 反応細胞および Con A 反応細胞の両者を著明に抑制しており、むしろ Con A 反応細胞の方に抑制が強い傾向があった。B-cell mitogen といわれる LPS に対する反応性は抗血清処理によって軽度ながら有意の低下がみられた (表 5)。これは RATS 中に抗 B 活性が残存していたためかも知れない。PWM はマウスの胸腺細胞も強く刺激し<sup>30)</sup>、またヒトの場合<sup>31)</sup> とは異なり T-cell の存在なしに B-cell を刺激する<sup>32)</sup>とも言われる。RATS は PWM に対する反応性を著明に抑制したが、これは主に T-cell に抑制がかかったためであろう。一般に、マウス脾細胞内の T-cell (θ-bearing cell) の分布は 35 % と低率である<sup>33)</sup>ことから、抗 B 活性の残存の可能性を細胞障害試験によって正確に判定することは困難であった。なお rabbit anti-human thymocyte serum が mouse thymocyte にも cytotoxic であり、ヒトとマウスの T-cell における共

通抗原性が指摘されている<sup>34)</sup>が、本研究において作製した RATS には細胞障害試験でみたところ、ヒトの末梢リンパ球に対する cytotoxicity はなかった。

MLC において responder の脾細胞を抗血清前処理すると<sup>3</sup>H-TdR の取り込みは著明に減少し、RATS 処理群と RATS/FL 処理群との間に差はなかった (表 6)。MLC における responder が T-cell であることは種々の検討<sup>35)36)</sup>から明らかにされていることから RATS および RATS/FL は強い抗 T 活性を保持していると考えられ、これは Ochiai<sup>37)</sup>らや Woody<sup>38)</sup>の成績と一致する。一方、stimulator を前処理すると<sup>3</sup>H-TdR の取り込みの軽度の減少傾向がみられた (表 7)。Stimulator としての機能を持つ subpopulation については、T-cell も stimulate する<sup>39)</sup>、T-cell の関与は少ない<sup>36)40)</sup>、などと一致していない点もあるが、B-cell に特徴的にみられる Ia 抗原に対する抗血清が stimulation を障害すること<sup>41)42)</sup>より、少なくとも stimulation の大部分は Ia 陽性細胞によるものと考えられる。

最も単純で定量的な GVH assay と言われる脾細胞の spontaneous <sup>3</sup>H-TdR uptake を RATS および RATS/FL 前処理によって著明に抑制することができた (表 8)。これは RATS が GVH-inducing cell である T-cell を障害していると考えられ、強い抗 T 活性を示すものといえる。GVHR における donor cell の proliferative activity を放射性物質で定量化する方法は、weight assay とよく相関する<sup>43)</sup>と言われるが、Simonsen の splenic weight assay などの proliferative assay と recipient の死亡率とは必ずしも相関しないという批判<sup>2)</sup>がある。本研究で用いた Strong の GVH assay はいわば in vivo MLC であり、GVHR の recognition-proliferation phase に相当するものであるが、effector phase を反映しているとは言えない。マウスでは MLC positive の場合は GVHR が強いが、必ずしもすべてが死亡するわけではなく、cell-mediated lympholysis (CML) が死亡率と関連する<sup>44)</sup>と言われている。また実際の骨髄移植において MLC positive と graft rejection はよく相関しており<sup>45)</sup>、donor は MLC identical が必須条件とされているが、HLA identical, MLC positive の sibling donor からの移植成功例<sup>46)47)</sup>、あるいは MLC negative sibling からの cytotoxic effector cell が誘導されるという報告<sup>48)</sup>がされており、effector phase についての検討も必要である。Survival assay は donor T-cell の proliferation recognition の結果産生された effector cell が各臓器を攻撃し死に至

る過程を生存率でみるもの<sup>49)</sup>であるが、RATS/FL 処理群は GVHR を克服し、RATS 処理群に比べはるかによい生存率を示した (表 9)。これは単に GVHR を防止するというだけでなく、救命するという点でも RATS/FL の有効性を示すものである。一方、RATS 処理群では RATS により T-cell が除かれているが、同時に存在する幹細胞抑制効果のため、致死量の X 線照射による骨髄無形成を回復させることなく早期に死に至るものであろう。このように RATS 処理群と照射のみの群では骨髄形成により、NRS 処理群では GVHR により死亡すると考えられ、経日的な観察では死亡の症状は全身衰弱や下痢などで照射群と RATS 群の間に著明な徴候の差はみられなかった。また RATS/FL の救命効果は C57BL→C3H という H-2 barrier を越えて成立している点は注目に値する。kolb<sup>50)</sup>はイヌにおいて ATS の使用により同様な成績を示している。ヒトにおいても HLA-identical sibling 以外を donor とすることが ATS を使用することにより可能となることも考えられる。

ATS には力価の安定性や製法などの他に、ヒトに投与する際には異種血清であるため、局所の反応、ショックなどの複雑な問題も多い。しかし、本研究で行ったような骨髄細胞の前処理法は、これらの問題を回避できるだけでなく、T-cell に対しより直接的な作用をもたらす最も期待できる ATS の使用法の一つである。最近このような方法でのヒト骨髄移植の試み<sup>50)</sup>もなされており、今後さらに ATS の有用性が高まるものと期待される。

## 結 論

ヒト骨髄移植において生じる GVHR を防止ないし軽減する方法を見出すことを目的として、抗マウス胸腺細胞血清 (RATS) を作製し、抗血清とマウス骨髄細胞とを incubation することによって免疫担当細胞を除去する試みについて検討した。

1. RATS は造血幹細胞活性を抑制し、この抑制の発現には incubation の際に補体の存在を必要としなかった。

2. 抗幹細胞活性を除去するために、RATS を骨髄細胞で吸収すると多能性幹細胞である CFU-s は変化しなかったが、赤芽球系幹細胞では軽度ではあるが有意の回復を示した。胎児幹細胞で吸収すると (RATS/FL)、抗幹細胞活性は完全に除去された。

3. RATS/FL の T-リンパ球抑制効果は、PHA, ConA, PWM に対する反応性、MLC における responding activity, Strong の GVH 反応性を著明

に抑制するなど、RATSのそれと有意性はなかった。  
またB-cell活性を表わすと考えられるLPSに対する反応性、MLCにおけるstimulating activityに対しては著明な影響を与えなかった。

4. Survival assayにおいてRATS処理群は早期に死亡するのに対し、RATS/FL処理群はGVHRを克服し70%以上が生存した。

5. 以上の成績により胎児幹細胞で吸収した抗胸腺細胞血清の利用により骨髓細胞より免疫担当細胞を除去することは可能であり、幹細胞に富んだ細胞成分を移植することによってGVHRを予防ないし軽減できることが示された。

稿を終るに臨み、御指導と御校閲を賜りました恩師服部絢一教授に深謝いたします。また終始直接御指導、御助言を戴いた本学輸血部原田実根講師に深く感謝いたします。併せて種々の援助協力をいただいた金沢大学癌研究所分子免疫部および第三内科の諸先生、また三輪晴美嬢、油屋秀子嬢に厚くお礼を申し上げます。

本研究は文部省科学研究費(144046)および厚生省特定疾患(特発性造血障害)研究費によりなされた。記して感謝の意を表する。

## 文 献

- 1) Thomas, E. D., Storb, R., Clift, R. A., Fefer, A., Johnson, F. L., Neiman, P. E., Lerner, K. G., Glucksberg, H., & Buckner, C. D. : Bone Marrow Transplantation (second of two parts). *N. Eng. J. Med.*, **292**, 895-902 (1975).
- 2) Grebe, S. C. & Streilein, J. W. : Graft-versus-host reactions (a review). *Advances in Immunology*, **22**, 119-221 (1976).
- 3) Harada, M., Takiguchi, T. & Hattori, K. : T cell function detected in murine bone marrow cells. *Jap. J. Exp. Med.*, **47**, 15-24 (1977).
- 4) Harada, M. : Prevention or reduction of GVH reaction. *Acta Hemat. Jap.*, **40**, 909-919 (1976).
- 5) Gray, L. G., Monaco A. P., Wood, M. L., & Russell, P. S. : Studies on heterologous anti-lymphocyte serum in mice. *J. Immunol.*, **96**, 217-238 (1966).
- 6) Tutschka, P. J. & Santos, G. W. : Bone marrow transplantation in the Busulfan-treated rat. *Transplantation*, **20**, 101-122 (1975).
- 7) Till, J. E. & McCulloch, E. A. : A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiation Research*, **14**, 213-222 (1961).
- 8) Bennett, M., Cudkowicz, G., Foster, R. S. Jr. & Metcalf, D. : Hemopoietic progenitor cells of W anemic mice studied in vivo and in vitro. *J. Cell. Physiol.*, **71**, 211-226 (1968).
- 9) Sharkis, S. J., Strong, D. M., Ahmed, A. & Sell, K. W. : Tritiated thymidine incorporation and cell-mediated lympholysis as correlates of acute graft-versus-host reaction. *Exp. Hemat.*, **5**, 443-455 (1977).
- 10) Rogentine, G. N. Jr., Rosenberg, E. B., Merritt, C. B., Rosenberg, S. A., Yankee, R. A., Graw, G. G. Jr., Greipp, P., Whang-Peng, J. & Fahey, J. L. : Antilymphocyte globuline as the sole immunosuppressant for bone marrow transplantation in aplastic anemia. *Transplantation*, **15**, 514-519 (1973).
- 11) Mathe, G. & Schwarzenberg, L. : Bone marrow transplantation in France, 1958-73. *Transplant. Proc.*, **6**, 335-343 (1974).
- 12) Storb, R., Gluckman, E., Thomas, E. D., Buckner, C. D., Clift, R. A., Fefer, C. A., Glucksberg, H., Graham, T. C., Prhnson, F. L., Lerner, K. G., Neiman, P. E., & Ochs, H. : Treatment of established human graft-versus-host disease by antithymocyte globulin. *Blood*, **44**, 57-75 (1974).
- 13) Mookerjee, B. K., Azzolina, L. & Ponlter, L. : Interaction of antithymocyte serum with hematopoietic stem cell. *J. Immunol.*, **112**, 822-829 (1974).
- 14) De Meester, J. R., Anderson, N. D. & Shafner, C. F. : The effect of heterologous antilymphocyte serum on mouse hemopoietic stem cells. *J. Exp. Med.*, **127**, 731-738 (1968).
- 15) Field, E. W. & Gibbs, J. E. : Cross-reaction of anti-lymphocytic globulin. *Nature*, **217**, 561-562 (1968).
- 16) Barrett, A. J., Humkle, J. G. & Hobbs, J. R. : Bone marrow suppression by anti-lymphocytic globulin. *British Med. J.*, **7**, 541-541 (1975).
- 17) Mosedale, B., Smeth, M. A. & Courtenay, J. S. : Preparation and characterization of antithymocyte serum and globulin without stem cell activity. *Transplantation*, **22**, 122-131 (1976).
- 18) Rodt, H., Thierfelder, S. & Eulitx, M. : Anti-



lymphocytic antibodies and marrow transplantation. II. Effect of heterologous anti-brain antibodies on acute secondary disease in mice. *Eur. J. Immunol.*, **4**, 25-29 (1974).

19) **Monette, F. C., Eichacker, P. Q., Graver, R. L., Byrt, W. & Gilio, M. J.** : Characterization of the anti-stem cell activity of anti-mouse brain serum. *Exp. Hemat.*, **6**, 299-310 (1978).

20) **Filppi, J. A., Rheins, M. S. & Nyerges, C. A.** : Antigenic cross-reactivity among rodent brain tissues and stem cells. *Transplantation*, **21**, 124-128 (1976).

21) **Tyan, M. L. & Ness, D. A.** : Modification of the mixed leukocyte reaction with various antisera. *Transplantation*, **13**, 198-201, (1972).

22) **Barrett, A. J., Longhust, P., Rosengurt, N., Hobbs, J. R. & Humble, J. G.** : Crossreaction of antilymphocyte globulin with human granulocyte colony-forming cells. *J. Clin. Path.*, **31**, 129-235 (1978).

23) **Van den Eugh, G. J. & Golub, E. S.** : Antigenic differences between hematopoietic stem cells and myeloid progenitors. *J. Exp. Med.*, **139**, 1621-1627 (1974).

24) **Adler, S., Ruznetsky, R. K., & Trobaugh, F. E. Jr.** : Additional characteristics of rabbit anti-mouse brain antiserum. *Blood*, **48**, 970-970, (1978).

25) **Bortin, M. M. & Saltztein, E. C.** : Immunologic incompetence of mouse pernatal liver hematopoietic cells against transplantation antigen. *J. Immunol.*, **100**, 1215-1218 (1968).

26) **Bortin, M. M., & Rimm, A. A.** : Severe combined immunodeficiency disease, characterization of the disease and results of transplantation. *J. A. M. A.*, **238**, 591-600 (1977).

27) **Richie, E. R., Gallagher, M. T. & Tretin, J. J.** : Prevention of graft-versus-host disease by Fab fragment derived from ALG. *Transplant. Proc.*, **5**, 873-876 (1973).

28) **Rodt, H., Thierfelder, S., Thiel, E., Gotze, D., Netzel, B., Huhn, D. & Eulitz, M.** : Identification and quantification of human T-cell antigen by antisera purified from antibodies cross-reacting with hemopoietic progenitors and other blood

cells. *Immunogenetics*, **2**, 411-430 (1975).

29) **Waterfield, J. D., Ekstedt, R. D. & Moller, G.** : Functional heterogeneity of splenic T lymphocyte subpopulations. *Scand. J. Immunol.*, **6**, 615-623 (1977).

30) **Peavy, D. L., Adler, W. H., Shands, J. W. & Smith, R. T.** : Selective effect of mitogens on subpopulations of mouse lymphoid cells. *Cell. Immunol.*, **11**, 86-98 (1974).

31) **Massip, J. C. H. & Mathieu, O.** : In vitro studies on human blood T cell purified population. *Immunology*, **29**, 445-453 (1975).

32) **Shortman, K., Byrd, W., Cerottini, J. C. & Brunner, K. T.** : Characterization and separation of mouse lymphocyte subpopulations responding to phytohemagglutination and pokeweed mitogens. *Cell. Immunol.*, **6**, 25-40 (1973).

33) **Cantor, H.** : The effect of anti-theta antiserum upon graft-versus-host activity of spleen and lymph node cells. *Cell. Immunol.*, **3**, 461-469 (1972).

34) **Maznina, T. P. & Kushner, S. G.** : Studies human brain-thymus cross-reactive antigen. *J. Immunol.*, **117**, 818-821 (1976).

35) **Van Boehermer, H.** : Separation of T and B lymphocyte and three role in the mixed lymphocyte reaction. *J. Immunol.*, **112**, 70-78 (1974).

36) **Blomgren, H.** : Subpopulations of cells involved in the human mixed lymphocyte culture response. *Scand. J. Immunol.*, **6**, 857-866 (1977).

37) **Ochiai, I., Ahmed, A. Strong, D. M., Scher, I. & Sell, K. W.** : Specificity and immunosuppressive potency of a rabbit antimouse T cell-specific antiserum. *Transplantation*, **20**, 198-210 (1975).

38) **Woody, J. M. & Ahmed, A.** : Human T-cell heterogeneity as delineated with a specific human thymus lymphocyte antiserum. *J. Clin. Invest.*, **55**, 956-966 (1975).

39) **Sondel, P. M., Chess, L. & Schlossman, S. F.** : Immunologic function of isolated human lymphocyte subpopulations. *Cell. Immunol.*, **351** - 359 (1975).

- 40) Van Oers, M. H. & Zeijlemaker, W. P. : The mixed lymphocyte reaction stimulatory capacity of human lymphocyte subpopulations. *Cell. Immunol.*, **31**, 205-215 (1977).
- 41) Schwartz, R. H., Fathman, C. G. & Sachs, D. H. : Inhibition of stimulation in murine mixed lymphocyte cultures with an allo-antiserum directed against a shared Ia determinant. *J. Immunol.*, **116**, 929-935 (1976).
- 42) Kano, S., Bloom, B. R. & Shreffler, D. C. : Blocking of MLC stimulation by anti-Ia sera. *J. Immunol.*, **117**, 242-245 (1976).
- 43) Baines, M. G. & Micklem, H. S. : A method for the quantitation of the localized graft-versus-host response in the mouse by uptake of <sup>125</sup>IUDR. *Transplantation*, **20**, 512-517 (1975).
- 44) Elkins, W. L. : Correlation of graft-versus-host mortality and positive CML assay in the mouse. *Transpl. Proc.*, **8**, 343-347 (1976).
- 45) Mickelson, E. M., Fefer, A., Storb, R. & Thomas, E. D. : Correlation of the relative response index with marrow graft rejection in patients with aplastic anemia. *Transplantation*, **22**, 294-300 (1976).
- 46) Gale, R. P. for the UCLA bone marrow transplantation team : Bone marrow transplantation between mixed lymphocyte culture-reactive individuals. *Transplantation*, **2**, 194-197 (1975).
- 47) Feig, S. A. for the UCLA bone marrow transplantation team : Successful bone marrow transplantation against mixed lymphocyte culture barrier. *Blood*, **48**, 385-391 (1976).
- 48) Long, M. A. & Handwerger, B. S. : The genetics of cell-mediated lympholysis. *J. Immunol.*, **117**, 2092-2099 (1976).
- 49) Klein, J. & Chiang, C. L. : Ability of H-2 regions to induce graft-vs-host disease. *J. Immunol.*, **117**, 736-740 (1976).
- 50) Kolb, H. J., Rieder, I., Rodt, H., Netzel, B., Grosse-Wilde, H., Scholz, S., Schaffer, E., Kolb, H. & Thierfelder, S. : Antilymphocytic antibodies and marrow transplantation. VI. Graft-versus-host tolerance in DLA-incompatible dogs after in vitro treatment of bone marrow with absorbed antithymocyte globulin. *Transplantation*, **27**, 242-245 (1979).

**Fundamental studies on Bone Marrow Transplantation; Elimination of Immunocompetent Cells from Spleen and Bone Marrow Cells by Anti-Thymocyte Serum for Prevention of Graft-versus-Host Reaction.** Hideki Kodo, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. J. Jusen Med. Soc., 89, 210–220 (1980).

**Abstract** In order to prevent or minimize graft-versus-host reaction (GVHR) occurring after allogeneic bone marrow transplantation, whether or not rabbit anti-mouse thymocyte serum (RATS) was available was investigated in careful consideration of its anti-stem cell activity.

RATS had suppressive effect on CFU-s and this effect did not require the exogeneous complement. When RATS was absorbed with bone marrow cells anti-stem cell activity did not change on CFU-s assay as compared with RATS not absorbed, but it considerably lowered in  $^{59}\text{Fe}$  spleen uptake assay. RATS absorbed with fetal liver cells (RATS/FL), however, anti-stem cell activity was completely removed as measured by the both assay systems.

RATS/FL suppressed clearly the responses of mouse spleen cells to PHA, Con A, and PWM, their responding activity in MLC and reactivity in Strong's GVHR assay just as did RATS. The mice transplanted with RATS-treated cells died earlier, in 14 days at longest after transplantation, while as for the ones transplanted with RATS/FL-treated cells, 73% of all those tested survived more than 40 days after transplantation.

The above-mentioned results strongly suggest that anti-thymocyte serum absorbed with fetal liver, when incubated with marrow graft before transplantation, could be a potential weapon to prevent GVHR in bone marrow transplantation without any inhibition of hematopoiesis.